

日本国特許庁 06.08.98  
 PATENT OFFICE  
 JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
 いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
 with this Office.

出願年月日  
 Date of Application:

1997年 8月12日

REC'D	02 OCT 1998
WIPO	PCT

出願番号  
 Application Number:

平成 9年特許願第251264号

出願人  
 Applicant(s):

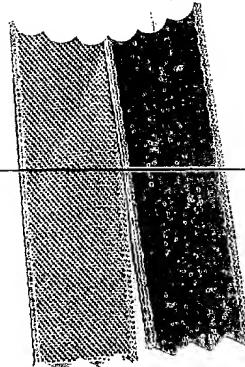
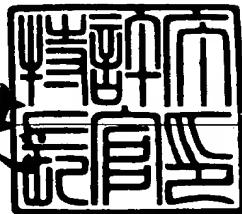
中外製薬株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1998年 9月18日

特許庁長官  
 Commissioner,  
 Patent Office

伊佐山建



出証番号 出証特平10-3073853

【書類名】 特許願  
 【整理番号】 P9-2300  
 【提出日】 平成 9年 8月12日  
 【あて先】 特許庁長官殿  
 【国際特許分類】 A61K 31/00  
 【発明の名称】 骨吸収関連疾患治療剤  
 【請求項の数】 7  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
   【氏名】 遠藤 弘一  
 【発明者】  
   【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内  
   【氏名】 草野 健一郎  
 【特許出願人】  
   【識別番号】 000003311  
   【郵便番号】 115  
   【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号  
   【氏名又は名称】 中外製薬株式会社  
   【代表者】 永山 治  
   【連絡先】 郵便番号 104 住所又は居所 東京都中央区京橋2丁目1番9号 氏名又は名称 中外製薬株式会社 知的財産部 電話番号 03(3273)1139  
 【提出物件の目録】  
   【物件名】 明細書 1  
   【物件名】 図面 1  
   【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 骨吸収関連疾患治療剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 iNOS選択的阻害剤を有効成分とする骨吸収関連疾患治療剤

【請求項 2】 骨粗鬆症治療剤として用いる請求項 1 記載の骨吸収関連疾患治療剤

【請求項 3】 骨量維持剤として用いる請求項 1 記載の骨吸収関連疾患治療剤

【請求項 4】 骨吸収抑制剤として用いる請求項 1 記載の骨吸収関連疾患治療剤

【請求項 5】 腫瘍細胞の骨転移阻害剤として用いる請求項 1 記載の骨吸収関連疾患治療剤

【請求項 6】 腎炎治療剤として用いる請求項 1 記載の骨吸収関連疾患治療剤

【請求項 7】 慢性腎不全の進行遅延剤として用いる請求項 1 記載の骨吸収関連疾患治療剤

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、iNOSが病態の発症または進展に係わる骨吸収関連疾患を治療する薬剤に関する。すなわち、本発明は、iNOS選択的阻害剤を有効成分とする骨吸収関連疾患治療剤に関する。さらに詳しくは、本発明は、iNOS選択的阻害剤を有効成分とする、骨粗鬆症治療剤、骨量維持剤、骨吸収抑制剤、腫瘍細胞の骨転移阻害剤、腎炎治療剤、慢性腎不全の進行遅延剤に関する。

【0002】

【従来の技術】

Nitric oxide (NO) は、従来平滑筋細胞の弛緩因子の本体として理解されてきたが、最近の研究により様々な組織で多彩な作用を発揮することが報告されている (Nathan, C. F. & Hibbs, J. B. Jr. : Cur. Opin. Immunol., 3:65-70, 1990, Liew, F. Y. & Cox, F. E. G. : Immunol. Today, 12:A17-21, 1991)。NOの产生は、NO synthase (NOS) により

制御されており、NOSには現在3種類のアイソフォームが存在することが知られている (Forstermann, U., Schmidt, H. H. H. W., et al Biochem. Pharmacol. 42: 1849-1857, 1991)。その中の1つである、type II NOS (inducible NOS: iNOS) は、種々のサイトカインにより発現制御を受けることから各種病態に関与する可能性が指摘されている (Moncada, S. et al Pharmacol. Rev., 43: 109-142, 1991, Nathan, C FASEB J. 6: 3051, 1992)。

#### 【0003】

近年、骨代謝を調節する因子として、NOが注目されている。NO donorであるニトログリセリンが骨減少抑制に効果を発揮することが報告された (Wimalawansa S. J., et al 1996 Bone 18: 301-304)。また、NO donorであるsodium nitropusside (SNP) が骨吸収の指標であるpit形成を減少させることが報告された (Kasten T. P., et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3569-3573)。これらの報告から、NO産生促進が骨粗鬆症に対して治療的に働くものと考えられていた (Schmidt, H. H. H. W. et al 1992 J. Histochem. cytochem 40, 1439-1456)。一方で、骨粗鬆症に関与すると考えられている炎症性サイトカインである、IL-1、TNF-aなどは、iNOSを亢進させてNOの産生を促進させることが知られている (Mikka Hukkanen et al 1995 Endocrinology 136; 5445-5453, 1995)。

#### 【0004】

最近、アメリカ骨代謝学会において、健常人の骨組織では、type I NO S (Neural-constitutive NOS) およびtype III NOS (endothelial-constitutive NOS) のみが発現しているもののiNOSの発現は認められないことが報告された (Chow J. W. M., et al 1996. J. Bone Miner. Re

s. 11, supplement 1 : M354)。

一方、癌細胞が骨組織に生着する際の足場においては、骨吸収が活発に行われていることが知られている (Eilon G, Mundy GR, Nature. 1978; 276: 726-728, Mundy GR, Raissz LG, et al, N Engl J Med. 1974; 291: 1041-1046)。

また、腎炎惹起の最初のシグナルは、NF- $\kappa$ B遺伝子の活性化であり、これに引き続いて、iNOS遺伝子の活性化が起こることが知られている (Xie, et al J. Exp. Med., 177: 1779-1784, 1994)。

このように、NOが関係する、骨吸収関連疾患は、骨粗鬆症をはじめとして、腫瘍細胞の骨転移、腎炎、慢性腎不全といった多岐にわたる。

さて、WO96-30350号公報には、NOSが係わる疾患の治療剤として有用なアミジン誘導体が記載され、また、NOSが係わる疾患の一つとして骨粗鬆症が挙げられている。しかしながら、具体的なデータとしては、nNOSに対する阻害活性が開示されているのみである。

#### 【0005】

##### 【発明が解決しようとする課題】

前述したとおり、iNOSは、骨代謝に深く関与し、骨吸収に関係している。

本発明の治療剤の対象は、骨吸収関連疾患全般にわたるが、特に、骨粗鬆症、腫瘍細胞の骨転移、腎炎、慢性腎不全などが挙げられる。

骨粗鬆症は、高齢社会の到来とともに、医療のみならず社会的にも重要な課題として注目されている。骨粗鬆症の治療薬としては、エストロゲン、カルシトニン、活性型ビタミンD、ビタミンKおよびビスホスホネートなどが用いられているが、それぞれ回春現象、薬剤耐性、高カルシウム血症、溶血作用および薬剤耐性などの問題点があり臨床上の満足は十分とはいえない。

#### 【0006】

また、先に述べた、癌細胞の骨組織への生着と骨吸収の関係から、骨吸収を制御することにより、腫瘍細胞の骨転移を抑制することが考えられる。したがつ

て、腫瘍細胞の骨転移もまた、骨吸収に関連した疾患であるといえる。

また、N F - k B 遺伝子の活性化に続く i N O S 遺伝子の活性化により、腎炎が惹起されることから、i N O S を選択的に阻害することは、腎炎の治療上きわめて重要な意義をもつものといえる。さらに、慢性腎不全における尿毒症症状の改善および透析導入の遅延という点でも有意義である。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、i N O S が病態の発症または進展に係わる疾患を治療する薬剤に関するものであり、i N O S 選択的阻害剤を有効成分とする骨吸収関連疾患の治療剤を提供することを目的とする。

骨吸収に関連の疾患として先に、骨粗鬆症、腫瘍細胞の骨転移、腎炎、慢性腎不全などを挙げたが、i N O S を選択的に阻害することは、これらの疾患の治療上きわめて重要な意義をもつものといえる。したがって、i N O S の選択的阻害剤を、骨吸収関連疾患治療剤として使用することが考えられる。より詳細には、骨粗鬆症治療剤、骨量維持剤、骨吸収抑制剤、腫瘍細胞の骨転移阻害剤、腎炎治療剤、慢性腎不全の進行遅延剤などとして使用することが考えられる。

#### 【0008】

本発明者は、i N O S を選択的に阻害することが骨吸収関連疾患の治療につながるものと考え、銳意研究を重ねた結果、i N O S の選択的阻害剤が骨吸収に関連した疾患に有用であることを見いだし本発明を完成させた。とりわけ、前記の報告に記載された、骨粗鬆症とNOならびにNOSに係わる知見を踏まえて、正常状態においてはi N O S は発現せず、病態時にi N O S が発現していると考えた。そこで、i N O S を選択的に阻害することが骨粗鬆症の治療につながると考えて検討した結果、i N O S 選択的阻害剤が、IL-1あるいはTNF- $\alpha$ などで惹起されたと考えられる骨粗鬆症の病態において認められる骨吸収を阻害することにより骨の減少を抑制することを見いだした。

#### 【0009】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の治療剤は、有効成分であるi N O S 選択的阻害剤に、生理的に無害な

固体または液体の製剤担体を配合した種々の医薬組成物として使用することができる。この医薬組成物は、投与方法に応じた各種の製剤形態に調製され、使用される。製剤形態としては、錠剤、顆粒剤、丸剤、カプセル剤、水剤、シロップ剤、懸濁剤、乳剤、軟膏、貼付剤などが挙げられる。製剤担体として、通常用いられる賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、被覆剤、溶解補助剤、乳化剤、懸濁化剤、安定化剤、または溶剤を使用することができる。本発明の治療剤は、経口剤あるいは注射剤として全身投与したり、外用剤などの局所投与も可能である。

#### 【0010】

本発明のiNOS選択的阻害剤の投与量は、患者の年齢、性別、症状の重篤度、投与経路などによって異なるが、通常成人一日当たり、例えば、0.01mg～1000mgであり、好ましくは0.1mg～100mgである。

#### 【0011】

本発明の、腫瘍細胞の骨転移阻害剤については、高頻度で骨への転移が認められているヒト肺癌由来のHara細胞を用いて作製される骨転移モデルを使用して、骨転移に対する予防効果を確認することができる。

本発明の腎炎治療剤については、5/6腎臓摘出術により作製される腎不全ラットを使用して、腎炎の進展に対する遅延効果ならびに慢性腎不全の進行抑制効果を確認することができる。

#### 【0012】

##### 【実施例】

以下に、実施例により本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0013】

##### 【実施例1】卵巣摘出骨粗鬆症ラットに対する効果

Wistar-Imamichi雌性ラットに両側卵巣の摘出(OVX)を施した。試験薬剤として、L-N-6-(1-イミノエチル)リシン塩酸塩(NIL)およびS-エチルチオウレア(EIT)を用いた。これらの薬剤は、iNOS選択的阻害剤であることが知られている(W. M. Moore et al. : J. Med. Chem., 37, 3886 (1994); W. Ross Tr

acey et al. Can. J. Pharmacol. 73: 665-669 (1995)。また、試験系の妥当性を確認する目的で、17- $\beta$ -エストラジオール ( $\beta$ E2) を用いた。

## 【0014】

OVX後1日経過したラットの体重で7群（1群7匹）に分け、術後4日目より薬剤投与を開始した。また、対照群としてsham（疑似手術）群（7匹）を設けた。NILを0.1および0.02mg/kg（体重100g当たり0.1mlを投与）、週5回10週間経口投与を行った。

結果を図1に示す。

## 【0015】

## 【図1】

## 【0016】

図1に示したように、最終投与24時間後のOVX対照群の腰椎骨密度は、sham群を100%とすると85.2%と有意に減少した（ $p < 0.001$ ）。EIT投与群では、92.6%と対照群で認められた骨密度の減少を有意に抑制した（ $p < 0.01$ ）。

NIL投与群では、投与量0.1mg/kgにおいて90.2%と骨密度の減少抑制傾向が認められたものの、0.02mg/kgでは86.8%とOVX対照群の骨密度と同程度であった。

## 【0017】

最終投与後に採取した尿の生化学検査表を表1に示した。

## 【0018】

【表1】

## N O S 阻害剤投与後の尿中生化学パラメーター

尿中生化学パラメーター		
	投与量(mg/kg)	D-pyr/Cre
偽似手術群	溶媒	7.66±0.05**
卵巢摘出手術対照群	溶媒	11.83±2.02
NIL投与卵巣摘出手術群	0.1	10.43±1.15
	0.02	8.70±1.59**
EIT投与卵巣摘出手術群	0.1	9.95±1.71
βE <sub>2</sub> 投与卵巣摘出手術群	0.02	4.16±1.45***

Dunnett'sの多重比較により卵巣摘出手術対照群からの統計的有意差を  
\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001で示した。

例数=7

平均±標準偏差

## 【0019】

表1に示したように、OVX対照群では、骨吸収のマーカーであるデオキシビリジノリン(D-pyr)の排泄がsham群に比較して有意に亢進したが( $p < 0.01$ )、その亢進はNIL 0.02mg/kg投与により有意に抑制された( $p < 0.01$ )。EIT投与群では統計的な有意差は認められなかったものの減少傾向が観察された。

## 【0020】

## 【発明の効果】

本発明によれば、iNOS選択的阻害剤を有効成分とする骨吸収関連疾患治療剤が提供される。

## 【0021】

## 【図面の簡単な説明】

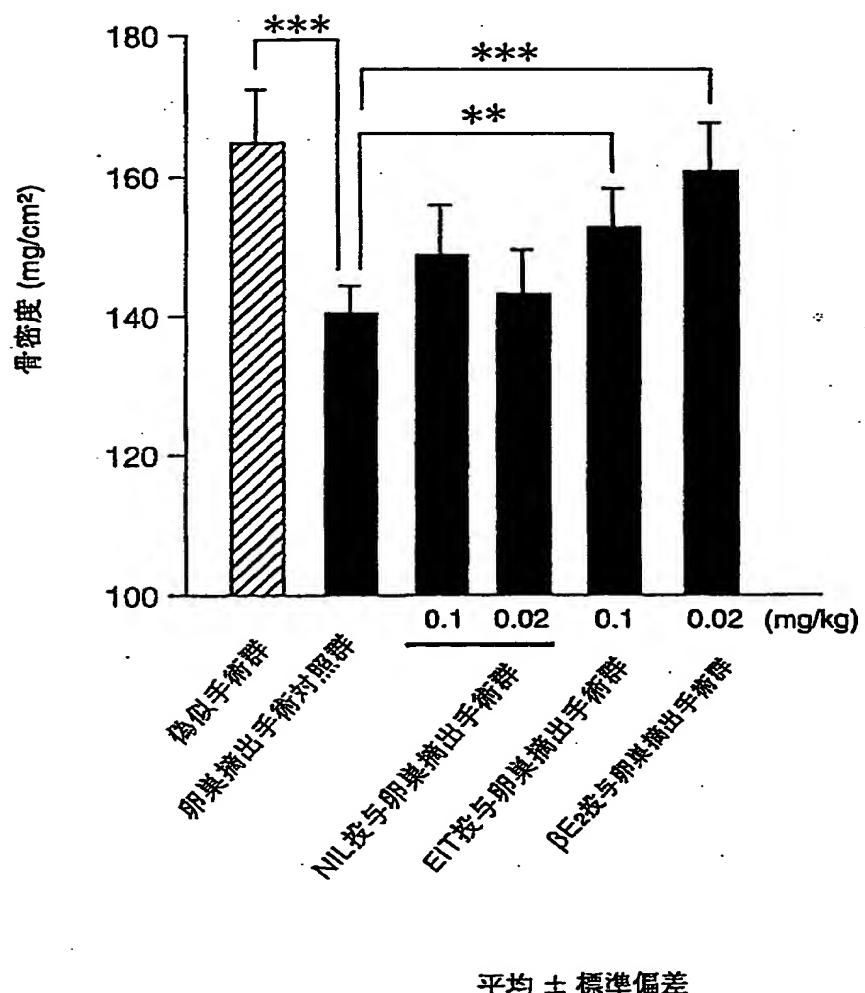
【図1】

腰椎骨密度の減少に対する抑制効果を示す図である。

【書類名】 図面

【図1】

## 腰椎（L2-L4）骨密度



Dunnett'sの多重比較により卵巢摘出手術対照群からの統計的有意差を  
\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001で示した。

【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 iNOS選択的阻害剤を有効成分とする骨吸収関連疾患治療剤。

【効果】 本発明の骨吸収関連疾患治療剤は、iNOS選択的阻害剤を有効成分とし、骨粗鬆症治療剤、骨量維持剤、骨吸収抑制剤、腫瘍細胞の骨転移阻害剤、腎炎治療剤、慢性腎不全の進行遅延剤として有用である。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】 申請人  
【識別番号】 000003311  
【住所又は居所】 東京都北区浮間5丁目5番1号  
【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

出願人履歴情報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号

氏 名 中外製薬株式会社